Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Untersuchungen über die Thermolabilität des Salmonellen-O-5-Antigens und Extraktionsmethoden zu seiner Anlagerung in der indirekten Haemagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Kimmig
aus Baden-Baden

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0006

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Untersuchungen über die Thermolabilität des Salmonellen-O-5-Antigens und Extraktionsmethoden zu seiner Anlagerung in der indirekten Haemagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Kimmig
aus Baden-Baden

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. med. H. J. Knüttgen
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R.-E. Bader
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. J. Knüttgen

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG 1

MATERIAL UND METHODIK 11

I Material 11

II Methodik 12

a) Methoden der Antigengewinnung für die indirekte Hämagglutination 12

b) Indirekte Hämagglutination 14

c) Hämagglutinations-Hemmungstest 15

d) Bakterienagglutination (Widal-Reaktion) 16

e) Absättigung nach Castellani 16

f) Immunisierung von Kaninchen 17

ERGEBNISSE 18

Teil I: Untersuchungen über die Thermolabilität des O-5-Antigens 18

Teil II: Versuche zur Anlagerung des O-5-Antigens an Hammelerythrocyten 22

A Serumversuche 22

B Versuche mit verschiedenen Antigenextraktionen .. 28

DISKUSSION 34

ZUSAMMENFASSUNG 42

LITERATURVERZEICHNIS 43

EINLEITUNG

1934 berichteten Felix und Pitt (1934a), daß ein Zusammenhang zwischen der Inagglutinabilität von S. typhi durch O-Seren und der Mäusepathogenität besteht. Die O-Inagglutinabilität ließ sich durch Hitze, Phenol und Alkohol beseitigen. Wenig später fanden Felix und Pitt (1934 b), daß ein bis dato unbekanntes Antigen die Ursache dieser unerklärlichen Inagglutinabilität war. Da die Virulenz der Typhusbakterien von der Anwesenheit dieses Antigens abhing, nannten sie es Vi-Antigen. Hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber Hitze stellten Felix, Bhatnagar und Pitt (1934) fest, daß 1-stündiges Erhitzen auf 60°C die Agglutinabilität völlig zerstört, während die Fähigkeit zur Antikörperbildung stark gemindert wird. Allein die agglutininbindende Eigenschaft blieb bei dieser Temperatur erhalten, desgleichen bei Erhitzen auf 100°C. (Fast 20 Jahre später stellte Spaun (1952) dann allerdings fest, daß diese Hitzelabilität nur scheinbar war, da das Vi-Antigen sehr leicht aus dem Bakterienleib herausgelöst wird. Mit Hilfe der indirekten Haemagglutination konnte er nachweisen, daß das gelöste Antigen auch nach mehrstündigem Erhitzen erhalten blieb. Auch Autoklavieren (siehe Kern 1968) führte nicht zu seiner Zerstörung.

Nach dieser Entdeckung des Vi-Antigens bei S. typhi lag es nahe, auch bei anderen Salmonellenarten nach Antigenen mit ähnlichen Eigenschaften zu suchen. So veröffentlichten Felix und Pitt (1936) eine Untersuchung, bei der sie weitere Vi-Antigene bei S. paratyphi A, S. paratyphi B und S. aertrycke (S. Typhimurium) gefunden hatten. Bei den genannten Arten konnten allerdings keine Stämme mit kompletter O-Inagglutinabilität nachgewiesen werden, so daß reine Vi-Seren nur durch Absättigen mit den homologen mit HCl behandelten Stämmen herstellbar waren. Hinsichtlich der Empfindlichkeit der neuen Vi-Antigene gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen ließ sich durch Agglutinations- und Absättigungsversuche fest-

stellen, daß 2 1/2-stündiges Erhitzen auf 100°C oder Behandlung mit verdünnter HCl die Antigene völlig zerstörte, während 96 % Alkohol, anders als bei dem Vi-Antigen von S. typhi, keine Wirkung zeigte. Serologisch waren die neuen Vi-Antigene von Typhus-Vi-Antigen verschieden. Untereinander erwiesen sich auffallenderweise die Vi-Antigene von S. paratyphi B und S. aertrycke als identisch, während das Vi-Antigen von S. paratyphi A andersartig war.

Dem Vorkommen eines S. paratyphi B und S. typhimurium gemeinsamen Vi-Antigens widersprach Kauffmann (1936 b). Er erklärte das Vi-Antigen für identisch mit einem Teil des Salmonellen-O-Antigens 5. Bei früheren Versuchen mit dem 0-5-Antigen hatte Kauffmann (1936 a) schon festgestellt, daß die agglutinablen, agglutininbindenden und agglutinogenen Eigenschaften durch Behandlung mit verdünnter HCl völlig zerstört wurden. Er hatte damals das 0-5-Antigen als homogen angesehen, jedoch hatte er nur Seren ververwendet, die mit auf 100°C erhitzten Bakterien der B-Gruppe hergestellt waren. In seiner Entgegnung auf die Arbeit von Felix und Pitt (1936) arbeitete er dann wie diese mit Seren, die mit lebenden S. paratyphi B- und S. typhimurium-Bakterien gewonnen worden waren. Bei fast völlig übereinstimmenden Ergebnissen in den entsprechenden Versuchen zog er jedoch andere Schlußfolgerungen. Er postulierte nun ein komplexes 0-5-Antigen mit 2 Anteilen, 5_1 und 5_2, 5_2 sollte dem Vi-Antigen von Felix und Pitt (1936) entsprechen. Es war im Gegensatz zu 5_1 thermolabil, durch 2 1/2-stündiges Erhitzen auf 100°C wurde es zerstört. Beiden Anteilen gemeinsam war die Unempfindlichkeit gegenüber Erhitzen auf 60°C oder Behandlung mit Alkohol, wohingegen sie bei Einwirkung von HCl vollständig zerstört wurden. Die Forderung, das Vi-Antigen als 5_2 zu bezeichnen, begründete er einerseits mit der immer gefundenen Koppelung mit 5_1, andererseits mit der unterschiedlichen Alkohol- und Hitzeempfindlichkeit gegenüber dem Vi-Antigen von S. typhi. Serologische Nachweise für die Verschiedenheit oder Gemeinsamkeit der beiden 0-5-Anteile konnte er jedoch nicht führen.

Auf Grund der Entdeckung, daß die Kapsel von Colibakterien durch 2-stündiges Erhitzen auf 120°C zerstört wird, stellte Kauffmann (1947) neue umfassende Untersuchungen über die Thermolabilität des 0-5-Antigens bei S. paratyphi- und S. typhimurium-Stämmen an. In Agglutinations-, Immunisierungs- und Absorptionsversuchen verglich er die Instabilität von 0-5 gegenüber 2-stündigem Erhitzen auf 100°C und 120°C. Dabei stellte er fest, daß die agglutinable Eigenschaft durch Kochen (100°C) sich kaum ändert, durch Autoklavieren (120°C) stark geschwächt wird, jedoch noch deutlich nachweisbar bleibt. Die agglutinogene Eigenschaft wurde durch Kochen stark herabgesetzt, durch Autoklavieren dagegen völlig zerstört. Die agglutininbindende Fähigkeit schließlich wurde durch Kochen nur gering reduziert, während Autoklavieren zu einer starken Schwächung, wenn auch nicht völligen Aufhebung führte. Auf Grund dieser Ergebnisse gab Kauffmann die Hypothese von der Existenz zweier verschiedener Anteile des 0-5-Antigens (5_1 und 5_2) auf. Er sah es nunmehr als homogenes Körperantigen an, das durch Hitze mehr oder weniger zerstört wird. Auf Grund seiner Alkoholresistenz ordnete er es den O-Antigenen zu, wegen seiner Labilität gegenüber Hitze und chemischen Einflüssen sollte es jedoch eine Sonderstellung einnehmen. 1951 gab Kauffmann auch diese Einordnung des 0-5-Antigens auf. Er faßte nunmehr 0-5-Antigen, Vi-Antigen und M-Antigen der Salmonellen auf Grund ihrer Thermolabilität unter der Gruppe der Kapsel (K)-Antigene zusammen, allerdings nicht ohne die Unterschiede zwischen diesen dreien zu betonen.

1952 versuchte Felix (1952 a) seine Ansicht, daß es sich beim 0-5-Antigen um ein Vi-Antigen handelt, weiter zu stützen. Zu diesem Zweck verglich er den Effekt verschiedener chemischer und physikalischer Einwirkungen auf die Vi-Antigene von S. typhi, S. paratyphi A (nach Kauffmann O-Antigen 2), S. paratyphi B und S. typhimurium. In sehr ausführlichen Versuchen bemühte er sich zu zeigen, daß sich die genannten Vi-Antigene gegenüber den Einwirkungen von HCl, NaOH, Aethylalkohol, Formalin und Hitze sehr ähnlich verhalten, und daß die vorhandenen Unterschiede lediglich gradueller Natur seien. Als Besonderheit stellte er lediglich noch die

reversible Zerstörung des Typhus-Vi-Antigens durch Phenol heraus, das die anderen Vi-Antigene unberührt ließ.

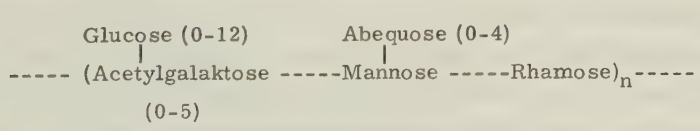
In einem 2. Bericht stellte Felix (1952 b) anhand von Titerunterschieden fest, daß manche Stämme von S. paratyphi B sich gegenüber O-Seren teilweise inagglutinabel verhielten, damit also den VW-Formen bei S. typhi entsprachen. Bei S. typhimurium war eine solche Teilagglutinabilität allerdings kaum nachweisbar. Im übrigen wurde die Frage, ob Vi- oder ob 0-5-Antigen zu einem reinen Definitionsstreit, über die Identität von Vi und 0-5 waren sich Felix und Kauffmann völlig einig. Einen Beitrag zur Serologie des 0-5-Antigens gab schließlich noch Mikulaszek (1959), indem er feststellte, daß der Faktor 0-5 für die Antigenverwandtschaft zwischen den Salmonellenspezies, die ihn enthalten, und dem Forssmann-Antigen verantwortlich zu machen ist.

Die ersten biochemischen Untersuchungen über das 0-5-Antigen verdanken wir Furth und Landsteiner (1929). Diese Autoren stellten fest, daß der Faktor 1 nach White (das spätere O-Antigen 5) eines S. paratyphi-B-Stammes sich bei der verwendeten Extraktionsmethode mit alkalischer Hypochloritlösung im Gegensatz zu den anderen O-Antigenen nicht gewinnen ließ. Nachdem es glückte, das 0-5-Antigen auf andere Art zu extrahieren, zeigte sich, daß es durch peptische oder tryptische Verdauung keine Veränderung erlitt, durch Alkali aber sofort zerstört wurde.

Von den Autoren, die sich in der Folgezeit mit der Aufklärung der biochemischen Struktur der Salmonellen-O-Antigene beschäftigten, sei nur Westphal genannt. Die Ergebnisse sollen zum Verständnis des folgenden kurz dargestellt werden: nach Westphal (1960) besteht ein komplettes O-Antigen aus einem Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Komplex. Das Protein ist als hochmolekularer Träger für die Antigenität als solche verantwortlich, das Lipoid - als Lipoid B bezeichnet - scheint keine Rolle zu spielen. Die Lipopolysaccharide, mit erwärmtem Phenol extrahierbar, (Westphal, Lüderitz und Bister 1952), sind die Träger der endotoxischen Manifestationen. Sie bestehen aus Polysacchariden und dem Lipoid A, einem Kephalin, das bei allen Enterobacteriaceae sehr ähnlich ist. Das

Polysaccharid ist demgegenüber spezifisch und führt zur Bildung der spezifischen Antikörper. Es besteht wiederum nach Davis et al. (1967) aus einem Kern (core) und Seitenketten, die die eigentlichen determinanten Gruppen der O-Antigene des Kauffmann-White-Schemas darstellen. Der Kern, der das gemeinsame R-Antigen der Salmonellen darstellt, besteht aus einem Rückgrat (backbone) aus Ketodesoxyoctonat (KDO), Heptose und Phosphat mit seitlichen Zuckerketten, die alle dieselbe Struktur aufweisen. An diesen Seitenzuckern des Kerns bzw. R-Antigens hängen nun Seitenketten, die sowohl die Gruppen- als auch die spezifischen Reaktionen der O-Antigene determinieren.

In Kenntnis dieser Grundzusammenhänge untersuchten Kotelko, Staub und Tinelli (1961) die biochemischen Ursachen für die Besonderheit des 0-5-Antigens. Den Autoren gelang es, aus einem Stamm von S. typhimurium ein Oligosaccharid zu isolieren, das im 5-Anti-5-System eine stark inhibitorische Wirkung zeigte. Dem in entsprechender Weise extrahierten Oligosaccharid aus einer 0-5-Verlustmutante fehlte dagegen diese Fähigkeit. Bei chemischer Untersuchung stellten sich beide Oligosaccharide als Hexasaccharide mit den Bausteinen Galactose, Mannose und Rhamnose heraus. Das inhibitorische Hexasaccharid besaß jedoch eine große Menge Acetylgruppen, die dem der 0-5-Verlustmutante fehlten. Daß diese Acetylgruppen die Träger der Antigenspezifität des 0-5-Antigens sind, ließ sich auch durch ihre Zerstörung mit Alkali nachweisen, nach der 0-5-Seren nicht mehr präzipitiert werden (wohl aber 0-4- und 0-12-Seren), außerdem durch die optimale Hemmung der 0-5-Antikörper durch Acetylgalactosamin. Schließlich konnten die Autoren experimentell zeigen, daß sich das 0-5-Antigen auf dem gleichen Molekül befindet wie die anderen 0-Faktoren. Nach Lüderitz, Staub und Westphal (1966) sähe die determinante Seitenkette der B-Gruppe der Salmonellen auf Grund aller, bis 1966 vorliegender Ergebnisse folgendermaßen aus:



Die Struktur des Vi-Antigens von S. typhi war schon früher aufgeklärt worden. Webster et al. (1954), Clark et al. (1958) und Heyns et al. (1959) fanden, daß das Vi-Antigen aus hochpolymerisierter D-Galaktosaminuronsäure bestand. Landy, Johnson und Webster (1961) stellten dann fest, daß die serologische Spezifität des Vi-Antigens in hohem Maße von Acetylgruppen bestimmt wird. Behandlung mit Alkali führte zu Deacetylierung und Depolymerisierung der Substanz und zerstörte damit die agglutinogene, agglutininbindende und agglutinable Fähigkeit. An reacetyliertem, alkalibehandeltem Antigen ließ sich dann zeigen, daß die Acetylgruppen vorzugsweise für die agglutininbindende und agglutinable Eigenschaft verantwortlich waren.

Die geschilderten biochemischen Ergebnisse seien nun kurz zusammengefaßt:

Das 0-5-Antigen kann nicht mehr als besonderes Antigen angesehen werden, wie Felix und zuletzt Kauffmann annahmen. Es handelt sich lediglich um eine spezifische Gruppe auf dem Körperantigen der Salmonellen der B-Gruppe und gehört zu den O-Antigenen. Das besondere chemische Verhalten beruht auf der Reaktivität der Acetylgruppen. Aus diesem Grunde ähnelt es darin dem Vi-Antigen von S. typhi, da hier ebenfalls reaktive Acetylgruppen auftreten. Diese Ähnlichkeit ist aber nur sehr partiell, da die Acetylgruppen des Vi-Antigens an einem völlig anders gebauten Molekül sitzen, womit dieses Antigen eine wirkliche Sonderstellung einnimmt.

Da die indirekte Haemagglutination die entscheidende Methode dieser Arbeit darstellt, soll darüber noch einiges gesagt werden. Diese Reaktion geht auf Keogh, North und Warburton (1947) zurück, die die Entdeckung machten, daß sich Antigen von Haemophilus influenzae so fest an die Oberfläche unbehandelter Erythrocyten absorbieren ließ, daß es bei Zugabe von komplementfreiem, homologem Antiserum zu einer Haemagglutination kam. Da die Erythrocyten nicht direkt mit dem Antikörper reagieren, sondern als Träger des Antigens fungieren, wurde diese Reaktion als indirekte, passive oder bedingte (conditioned) Haemagglutination bezeichnet (Neter 1956). In der Folgezeit ist eine große Zahl von Mikroorganismen gefunden worden - neben Bakterien auch Protozoen und Spro

gefunden worden - neben Bakterien auch Protozoen und Sproßpilze - mit deren Antigenen sich diese Reaktion durchführen läßt. Die Bakterienarten, die nach dieser Methode zu einer positiven Reaktion führen, sind von Neter (1956) zusammengestellt worden.

Der Vorteil der indirekten Haemagglutination gegenüber der Bakterienagglutination in Form der Gruber- oder Widal-Reaktion besteht in der höheren Empfindlichkeit (Neter 1956), gegenüber der Präzipitation dagegen in der erheblich besseren Ablesbarkeit und Unnötigkeit, adäquate Mengenverhältnisse zu schaffen. Durch die Möglichkeit, gleichzeitig verschiedene, bakterielle Antigene anzulagern, z.B. von Colibakterien, Salmonellen und Shigellen, kann man schließlich bestimmte polyvalente Antigene herstellen und zur Suche von Antikörpern bei bakteriellen Infektionen benutzen (Neter, Gorzynski, Gino, Westphal, Lüderitz 1956). Diesen Vorteilen stehen aber auch entscheidende Nachteile gegenüber. Zur indirekten Haemagglutination muß man die Antigene aufbereiten, die Erythrocyten damit beladen, das Komplement aus dem Serum entfernen und durch Absättigung eventuell vorhandene Antikörper gegen die verwendeten Erythrocyten beseitigen. Ein Problem stellt schließlich ein Antigen dar, das offenbar vielen Spezies der Enterobacteriaceae gemeinsam ist. Bei Seren mehrerer Tierarten fanden Kunin und Beard (1963), daß sich in der indirekten Haemagglutination mit Colibakterien verschiedener O-Gruppen positive Reaktionen zeigten, die sich nicht auf O-Antikörper zurückführen ließen. Bei Coli-Antiserum, besonders von Stamm 0_{14}, fanden sich in der indirekten Haemagglutination Kreuzreaktionen zu Salmonellen, Shigellen, Proteus und Aerobacter, so daß angenommen wurde, das Lipopolysaccharid der Enterobacteriaceae besitze 2 Typen von antigenen Determinanten, ein klassisches O-Antigen und eines, das allen Spezies dieser Familie gemeinsam ist (Kunin 1963). Bei der Untersuchung menschlicher Seren fand Walter (1968), daß die indirekte Haemagglutination unter anderem auch mit Typhusbakterien und Pasteurellen positiv ausfiel. Schließlich werden nach Untersuchungen von Bader (mündliche Mitteilung) auch immer häufiger Kaninchenseren gefunden, die ebenfalls mit Salmonellen und Pasteurella pseudotuberculosis Typ 1-5 zu einer positiven Haemagglutination führen, während die Bakterien-

agglutination negativ bleibt. Alle Agglutinine gegen Pasteurellen lassen sich durch Absättigung mit Typ 3 entfernen. Für die Salmonellen ist bisher kein ähnlicher Stamm gefunden worden, so daß man unter Umständen nur durch Titervergleiche diese "falschen" Haemagglutinationen von den "echten" (durch 0-Antigene und 0-Antikörper-Verbindung entstandenen) trennen kann.

Über den Mechanismus, sowie über die biochemischen und physikalischen Grundlagen der indirekten Haemagglutination weiß man bisher sehr wenig. Die bakteriellen Antigene, die sich an unbehandelte Erythrocyten anlagern lassen, stellten sich fast alle als Lipopolysaccharide heraus. Staub (1954) zeigte mit Antigen von S. typhi, das durch saure und alkalische Hydrolyse gewonnen worden war, ebenso Neter, Westphal, Lüderitz, Gorzynski, Eichenberger (1956) mit gereinigten, phenolextrahierten Lipopolysacchariden von E. coli und S. abortus equi, daß offenbar Lipoidanteile für die Anlagerung verantwortlich waren, da sie nach deren restloser Entfernung nicht mehr zu erzielen war.
An E. coli Kulturen stellten Neter et al. (1954) fest, daß Erhitzen bei der Gewinnung anlagerungsfähigen Antigens eine entscheidende Rolle spielt. Nach Annahme der Autoren hatte die Hitzebehandlung 2 Effekte, zum einen die Herauslösung des Antigens aus den Bakterienleibern, zum anderen eine zusätzliche Aktivierung des gelösten Antigens. Eine weitere Aktivierung durch die Behandlung mit NaOH fand Staub (1954) bei Antigen von S. typhi. Neter, Westphal, Lüderitz, Gorzynski, Eichenberger (1956) konnten dies bei phenolextrahierten Lipopolysacchariden von E. coli und S. abortus equi bestätigen. Sie stellten außerdem fest, daß bei NaOH- und Hitzebehandlung das Lipoid stark vermindert wird, jedoch immer einzelne Fettgruppen erhalten bleiben. Nach Lüderitz et al. (1958) werden dabei wahrscheinlich blockierende Gruppen vom Lipoidanteil abgespalten, so daß die eigentlichen rezeptoraktiven Strukturen freigesetzt werden. Da der Lipoidanteil in den Lipopolysacchariden vieler gramnegativer Bakterien, das sogenannte Lipoid A, wie schon erwähnt chemisch sehr ähnlich oder identisch ist, nahmen diese Autoren an, daß der Fixationsvor-

gang an Erythrocytenrezeptoren für alle mit Alkali behandelten Lipopolysaccharide prinzipiell von gleicher Art ist. Da nach den Ergebnissen von Neter et al. (1953, 1955) die Anlagerung von bakteriellen Antigenen durch Lipoide wie Lecithin, Kephalin und bestimmte Serumlipoidfraktionen gehemmt wird, hat man vermutet, daß Lipoidstrukturen in der Erythrocytenmembran als Rezeptoren dienen. Diese Rezeptoren sind offensichtlich von den Blutgruppenantigenen A, B und RH verschieden, da Humanerythrocyten nach Beladung mit Antigen von E. coli (Neter et al. 1952) und Pasteurella tularense (Wright und Feinberg 1952) nach wie vor für die entsprechenden Antikörper agglutinabel waren. Behandlung der Erythrocyten mit Perjodat oder Receptor destroying enzyme aus Choleravibrionen blieb ohne Einfluß auf die Anlagerung bakterieller Antigene (Hayes 1951 und Wright and Feinberg 1952). Darüber, ob die Rezeptoren alle gleichartig sind, oder ob für jedes bakterielle Antigen ein spezieller Rezeptor existiert, scheint keine Einigkeit zu herrschen. Landy (1954) nahm verschiedene Rezeptoren an, da er feststellte, daß sich bei gleichzeitiger oder succesiver Beladung der gleichen Erythrocyten mit 6 völlig verschiedenen Antigenen ebenso hohe Titer erreichen ließen, wie bei Einzelbeladung. Zu diesem Ergebnis kamen auch Neter, Gorzynski, Gino, Westphal und Lüderitz (1956). Landy (1954) gelang es zudem nicht, die Erythrocytenrezeptoren durch ein Antigen so abzublocken, daß die anderen 5 nicht mehr anlagerbar waren. Bei Lüderitz et al. (1958) dagegen findet sich die Ansicht, daß verschiedene Lipopolysaccharide um die gleichen Rezeptoren an der Erythrocytenoberfläche konkurrieren; die Affinität der einzelnen Antigene zum Rezeptor kann allerdings verschieden stark sein, was auch Spaun (1952) an Typhus-O- und Vi-Antigen feststellte. Der Prozeß der Anheftung selbst wurde lange Zeit als Adsorption bezeichnet, obwohl einige Gründe dagegen sprachen (Neter 1956). Es war außerdem bekannt, daß eine Anlagerung nur in isotonischer Lösung von bestimmten Elektrolyten, nämlich NaCl, KCl und Na-Citrat stattfand, nicht dagegen in isotonischer $CaCl_2$-, Glucose- oder Saccharose-Lösung (Neter und Zalewski 1953). 1958 konnte aber Lüderitz et al. (1958) mit P^{32}-markierten Lipopolysacchariden zeigen, daß es sich bei der Fixation von

alkaliaktivierten Lipopolysacchariden an Erythrocyten nicht um ein Adsorptionsphänomen, sondern um eine chemische Reaktion zwischen reaktiven Gruppen im Lipopolysaccharid und den Rezeptoren an der Erythrocytenoberfläche handelte. Diese Reaktion war eine Gleichgewichtsreaktion und demzufolge reversibel. Diese Ergebnisse stützen auch die Ansicht einheitlicher Erythrocytenrezeptoren.

In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob das zuvor in seinen Eigenschaften beschriebene 0-Antigen 5 wirklich thermolabil ist, oder durch Erhitzen wie das Typhus-Vi-Antigen nur in Lösung geht und damit in der Bakterienagglutination nicht mehr nachweisbar ist. Um dieses zu klären, sollte das durch Autoklavieren möglicherweise in Lösung gegangene 0-5-Antigen an Erythrocyten angelagert und in der indirekten Haemagglutination nachgewiesen werden. Falls das Antigen durch Autoklavieren nicht extrahierbar sein sollte, sollte mit Hilfe anderer Extraktionsmethoden eine Anlagerung versucht werden.

MATERIAL UND METHODIK

I MATERIAL

Es wurden die folgenden 19 Stämme verwendet; sie sind mit den Nummern der internationalen Salmonellenzentrale Kopenhagen bezeichnet:

Kulturen Stamm-Nr.		O-Antigen	H-Antigen 1. Phase	H-Antigen 2. Phase
5	S. paratyphi B var. java	4, 5, 12	b	---
7	S. paratyphi B var. odense 8085	4, 12	b	1,2
6	S. paratyphi B 5706 (chiefly nonspez.)	4, 5, 12	(b)	1,2
11	S typhimurium var. copenhagen 659	4, 12	i	1,2
13	S. typhimurium 0-Form 3173	4, 5, 12	---	---
22	S. essen 173	4, 12	gm	---
23	S. budapest	1, 4, 12	gt	---
34	S. cholerae suis 1348	6, 7	c	1,5
46	S. montevideo 623	6, 7	gms	---
50	S. newport 563	6, 8	eh	1,2
64	S. enteritidis 1891	1, 9, 12	gm	---
72	S. dar es salaam	1, 9, 12	lw	en-
76	S. london 1446	3, 10, 26	lv	1,6
84	S. newington C_2	3, 15	eh	1,6
96	S. gaminara 974	16	d	1,7
103	S. abony 74 (Kauffmann)	1, 4, 5, 12	b	enx
151	S. coeln	4, 5, 12	y	1,2
209	S. typhimurium 1074	4, 5, 12	i	---
248	S. paratyphi B 0-Form	4, 5, 12	---	---

Außerdem fanden folgende Seren Verwendung:

T 19 b hergestellt mit St. 248 S. paratyphi B O-Form lebend
T 45 hergestellt mit St. 248 S. paratyphi B O-Form 1 Std. 100°C
T 46 hergestellt mit St. 248 S. paratyphi B O-Form 2 Std. 100°C
T 115 hergestellt mit St. 248 S. paratyphi B O-Form 1 Std. 56°C
T 133 hergestellt mit St. 13 S. typhimurium O-Form lebend
T 134 hergestellt mit St. 248 S. paratyphi B O-Form in 0,3 % Formalin.

II METHODIK

a) Methoden der Antigen-Gewinnung für die indirekte Haemagglutination

1) Antigen-Extraktion durch Autoklavieren:

Bei dieser zur Durchführung der indirekten Haemagglutination üblichen Methode werden Drigalski-Schalen mit einer Bouillonkultur beimpft (1 ml je Schale) und 24 Std. bei 37°C bebrütet. Dann werden die Schalen mit je 3 ml physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und die Bakteriensuspension autoklaviert (1 Std. 120°C). Nach anschließendem 1-stündigem Zentrifugieren (10 000 U/Min.) kann das gelöste Antigen als Überstand abgenommen werden, das Sediment wird verworfen.

2) Antigen-Extraktion durch Kochen:

Drigalski-Schalen werden wie oben beschrieben beimpft, bebrütet und abgeschwemmt. Die Bakterienabschwemmung wird im strömenden Dampf von 100°C 1 Stunde erhitzt, danach 1 Std. bei 10 000 U/Min. zentrifugiert, wonach das Antigen als Überstand abgehoben werden kann.

3) Antigen-Extraktion durch phys. NaCl-Lösung: (nach Spaun 1952, mod.)

Drigalski-Schalen werden wie oben beimpft und bebrütet. Nach Abschwemmen der Bakterien mit je 5 ml phys. NaCl-Lösung pro Schale

läßt man die Bakteriensuspension unter gelegentlichem Aufschütteln 6 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Nach Abzentrifugieren der Bakterien (1 Std. 10 000 U/Min.) wird der Überstand als Antigen verwendet.

4) Antigen-Extraktion durch aqua dest.: (nach Spaun 1951)
Bakterien, die nach oben beschriebener Beimpfung und Bebrütung auf Drigalski-Schalen gewachsen sind, werden durch Abschwemmen mit 75 % Alkohol abgetötet und anschließend 1 Std. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Das Bakteriensediment wird in aqua dest. aufgenommen (7 ml aqua dest. für die Bakterien von 5 Drigalski-Schalen) und einige Stunden bei Zimmertemperatur belassen, um das Antigen in Lösung zu bringen. Durch Zentrifugieren (1 Std. 10 000 U/Min.) wird der Überstand vom Bakteriensediment getrennt und durch Zugabe von NaCl isotonisch gemacht.

5) Antigen-Extraktion durch Phenol in der Kälte: (nach Westphal, Lüderitz und Bister 1952)
Mit Bouillonkultur (1 ml je Schale) und 24 Std. bei 37°C bebrütete Drigalski-Schalen werden mit aqua dest. abgeschwemmt und 3 mal mit aqua dest. gewaschen, um Bouillon- und Nährbodenreste zu entfernen. Das nach Zentrifugieren (1 Std. 10 000 U/Min.) erhaltene, gewaschene Bakteriensediment von 10 Drigalski-Schalen wird in 120 ml aqua dest. von ca. 5°C suspendiert und mit 96 ml ebenfalls auf 5°C gekühltem Phenol in einer Stöpselflasche von 500 ml durch kräftiges Schütteln gemischt. Diese Mischung läßt man unter gelegentlichem Aufschütteln 4 Std. im Eisschrank stehen. Danach wird der Ansatz 20 Min. bei 3000 U/Min. in der Kälte zentrifugiert. Dies führt zur Ausbildung von 3 Schichten: oben befindet sich eine wässrige Schicht, darunter eine schmale Schicht, die aus Bakterien besteht, zuunterst liegt die Phenolschicht. Die wässrige Schicht, in der sich O-Antigene in Form von Glycoproteiden befinden, wird abgehoben, bei noch vorhandener Trübung nochmals 20 - 30 Min. bei 10 000 U/Min. zentrifugiert und dann 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser und 1 Tag gegen bewegtes

aqua dest. dialysiert. Das Innendialysat engt man im Vakuumrotationsverdampfer bei 25° - 35°C auf ein Volumen von ca. 10 ml ein. Zugabe von gekühltem Methylalkohol in ca. 15-facher Menge führt zum Ausfall des Antigens. Die Substanz fällt in weißen Flocken oder Fäden aus und setzt sich nach einiger Zeit von selbst ab, so daß der Alkohol ohne Zentrifugieren abgenommen werden kann. Nach Verdunsten des restlichen Alkohols wird die getrocknete Substanz in 10 ml phys. NaCl-Lösung aufgenommen und stellt konzentriertes Antigen dar.

Nach Absaugen der Bakterienschicht mit der Wasserstrahlpumpe wird die phenolische Phase, in der sich überwiegend Proteine befinden, mit der 6 - 10-fachen Menge gekühltem Methylalkohol versetzt, wobei das gelöste Material zum größten Teil ausflockt. Dieses wird 20 Min. bei 3000 U/Min. in der Kälte abzentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wird das Sediment 3 mal mit Alkohol gewaschen, um das restliche Phenol zu beseitigen. Anschließend wird es im Vakuumexsiccator mit Aceton getrocknet und danach in 10 ml phys. NaCl-Lösung aufgenommen.

b) Indirekte Haemagglutination:

Zur Durchführung dieser Reaktion benötigt man Hammelerythrocyten, Serum und gelöstes Antigen.

Defibriniertes Hammelblut wird zur Entfernung des Serums 3 mal mit phys. NaCl-Lösung gewaschen, das nach dem Zentrifugieren (3000 U/Min.) gewonnene Erythrocyten-Sediment wird auf 1 : 500 verdünnt.

Das Serum muß zur Vermeidung von Haemolyse 1/2 Std. im Wasserbad bei 56°C inaktiviert werden. Falls bei der früher durchgeführten Untersuchung des Serums Antikörper gegen Hammelerythrocyten festgestellt wurden (positive Serumkontrolle bei der indirekten Haemagglutination), muß das Serum zusätzlich mit Hammelerythrocyten abgesättigt werden. Dazu mischt man 5 ml 1 : 5 verdünntes Serum mit 5 ml Erythrocytensediment und inkubiert es 1 Std. im Wasserbad bei 37°; danach läßt man das

Gemisch einige Stunden im Kühlschrank stehen und zentrifugiert dann die Erythrocyten ab (10 Min. bei 3000 U/Min.).

Das Antigen wird nach einer der oben geschilderten Methoden hergestellt, für O-Haemagglutination üblicherweise durch Autoklavieren (Methode 1). Zur Durchführung einer Serumtiterbestimmung werden gleiche Teile Antigen mit gleichen Teilen der 1 : 500 verdünnten Erythrocytensuspension gemischt und 1/2 Std. im Wasserbad bei 37° inkubiert. Das überschüssige Antigen wird durch 3-maliges Waschen mit phys. NaCl-Lösung entfernt, das Erythrocyten-Sediment, das man nach dem Zentrifugieren (3 Min. bei 3000 U/Min.) erhält, wird in phys. NaCl-Lösung in der ursprünglichen Menge aufgenommen. Je 0,5 ml dieser nun mit Antigen beladenen Erythrocyten-Suspension gibt man in die Gläschen einer Serumverdünnungsreihe mit je 0,5 ml Inhalt. Die Gläschen werden zur Agglutination 1/2 Std. ins Wasserbad bei 37° gestellt, anschließend 3 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und danach abgelesen.

Für die Antigenkontrolle werden NaCl und beladene Erythrocyten, für die Serumkontrolle unbeladene Erythrocyten und Serum gemischt und im Hauptversuch mitgeführt.

c) Haemagglutinations-Hemmungstest (nach Kunin 1962):

Von dem zu untersuchenden Antigen wird eine Verdünnungsreihe hergestellt mit je 0,25 ml je Röhrchen. Dazu gibt man je 0,25 ml des bekannten Serums in konstanter Verdünnung. Das Antigen-Serum-Gemisch in den Röhrchen wird sodann 1/2 Std. im Wasserbad von 37°C inkubiert. Danach wird in jedes Röhrchen 0,5 ml einer Erythrocyten-Suspension gegeben, die nach der oben beschriebenen Methode mit Antigen, das den Serumantikörpern homolog ist, beladen wurde. Anschließend kommen die Röhrchen zur Agglutination 1/2 Std. ins Wasserbad von 37°C, werden danach 3 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und abgelesen. Die Serum- und Antigenkontrollen entsprechen im Prinzip denen der indirekten Haemagglutination.

d) Bakterienagglutination: (Widal-Reaktion)

Salmonellen, die auf Schrägagar 24 Std. bei 37°C gewachsen waren, werden mit je 3 ml phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Diese Suspension wird je nach Versuch

1) in dieser Form
2) nach 1-stündigem Erhitzen im Wasserbad auf 56°C
3) nach 1-stündigem Kochen in strömendem Dampf von 100°C
4) nach 3-stündigem Autoklavieren bei 12°C

einer phys. NaCl-Lösung zugefügt, bis die Dichte der Aufschwemmung dem Bacto-McFarland Bariumsulfat-Standard 3 (ca. 900 Mill. Bakterien/ml) entspricht. Davon gibt man je 0,5 ml in die Gläschen einer Serumverdünnungsreihe mit je 0,5 ml Inhalt. Die Gläschen werden zur Agglutination für 14 - 18 Std. ins Wasserbad von 52°C gestellt und dann abgelesen.

e) Absättigung nach Castellani:

Zur Absättigung von 1 ml konzentriertem Serum werden die Bakterien von 20 gut bewachsenen Drigalski-Schalen benötigt. Diese werden mit je 1 ml einer Bouillonkultur beimpft, 24 Std. bei 37°C bebrütet und dann mit 3 ml phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Diese Bakteriensuspensionen werden nun der Absättigungsart entsprechend verschieden behandelt:

1) Für die Absättigung mit lebenden Bakterien zentrifugiert man die Bakteriensuspension 1 Std. bei 10 000 U/Min., hebt den wässrigen Überstand ab und verwendet das Sediment zur Absättigung.

2) Für Absättigungen mit auf 56°C erhitzten Bakterien wird die Abschwemmung für 1 Std. ins Wasserbad von 56°C gestellt. Dann wird in gleicher Weise wie oben verfahren.

3) Für Absättigungen mit autoklavierten Bakterien wird die Bakterienabschwemmung 1 Std. bei 10 000 U/Min. zentrifugiert; nach Abnehmen des Überstandes wird das Sediment 1 Std. bei 120°C autoklaviert.

4) Für Absättigungen mit autoklavierten und zusätzlich gewaschenen Bakterien wird die Bakteriensuspension wie bei c) beschrieben zentrifu-

giert und autoklaviert. Das autoklavierte Sediment wird anschließend 3 mal mit phys. NaCl-Lösung gewaschen.

Die nach diesen verschiedenen Methoden gewonnenen Bakteriensedimente werden mit 5 ml 1 : 5 verdünntem Serum gründlich durchmischt und 4 Std. ins Wasserbad von 37°C gestellt. Nach anschließendem 1-stündigem Zentrifugieren bei 10 000 U/Min. wird das abgesättigte Serum abpipettiert.

f) Immunisierung von Kaninchen:

Mit Hilfe der indirekten Haemagglutination mit Antigenen von Salmonellenstämmen der Untergruppen B, C und D wurde untersucht, ob sich mit den Kaninchenseren die bereits beschriebenen "falschen", nicht durch O-Antigen-Antikörper-Verbindung entstandenen Reaktionen ergaben. Durch die dabei erforderlichen Serumkontrollen wurden gleichzeitig Antikörper gegen Hammelerythrocyten festgestellt. Um möglicherweise vorhandene O- und H-Antikörper zu erfassen, wurden zudem Widalreaktionen mit lebenden Salmonellenstämmen der gleichen Gruppen durchgeführt. Die Tiere mit dem niedrigsten Antikörpertiter wurden immunisiert.

Zur Herstellung des Antigens für die Immunisierung wurden 24 Std. bebrütete Schrägagarkulturen mit phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt, die Suspension auf Bacto-McFarland Bariumsulfat-Standard 3 eingestellt und folgendermaßen verwendet:

1) unerhitzt
2) 1 Std. auf 56°C erhitzt
3) mit Formaldehyd versetzt (Endkonzentration 0,3 %).

Diese Suspensionen wurden Kaninchen im Abstand von 3 - 4 Tagen in die Ohrvene injiziert. Man beginnt mit einer Dosis von 0,1 ml und steigert diese über 0,2 ml und 0,5 ml bis auf 1,0 ml. Nach 4 Injektionen wird ein Probetier bestimmt. Je nach dessen Höhe wird das Kaninchen entweder sofort oder nach einigen weiteren Injektionen (Dosis 1 ml) entblutet.

ERGEBNISSE

Bei den Experimenten wurde folgendermaßen vorgegangen:
In Teil I wurde das O-5-Antigen auf seine Thermolabilität untersucht. Auf Vorhandensein des O-5-Antigens wurden sowohl die Bakterien selbst geprüft - mit Hilfe der Bakterienagglutination nach Widal und der Bakterienabsättigung nach Castellani - als auch der nach Autoklavieren gewonnene Überstand. Methoden dafür waren die indirekte Haemagglutination und die Absättigung mit Antigen beladenen Hammelerythrocyten.

Teil I:
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THERMOLABILITÄT DES O-5-ANTIGENS

Zu diesen Versuchen wurde das Serum T 115 verwendet. Durch Widalreaktion wurde festgestellt, daß das unabgesättigte Serum Antikörper gegen O-4,5 und O-1 oder O-12 besaß, wie Tabelle 1 zeigt.

Tabelle 1 O-Widal

	St. 23 lebend 0–1,4,12	St. 64 lebend 0–1,9,12	St. 72 lebend 0–1,9,12	St. 5 lebend 0–4,5,12	St. 248 lebend 0–4,5,12	St. 248 120°C 0–4,(5),12
Serum T 115	640	320	320	5120	10240	5120

lebend = Suspension aus lebenden Bakterien
120°C = 1 Std. auf 120° C erhitzte Bakteriensuspension.

Um die agglutininbindende Eigenschaft des O-5-Antigens vor und nach verschiedener thermischer Behandlung zu untersuchen, wurden die folgenden Absättigungen (Seren A - D) mit Bakterien von St. 248 S. paratyphi B O-Form (O-4, 5, 12) durchgeführt. Eine weitere Absättigung (Serum E) mit beladenen Erythrocyten (Antigen von St. 248) sollte einen Hinweis auf die Anlagerbarkeit von O-Antigen 5 geben.

Serum A: T 115 abgesättigt mit lebenden Bakterien
Serum B: T 115 abgesättigt mit 1 Std. auf 56°C erhitzten Bakterien
Serum C: T 115 abgesättigt mit 1 Std. auf 120°C erhitzten Bakterien.
Serum D: T 115 abgesättigt mit 1 Std. auf 120°C erhitzten Bakterien, die zudem ausgewaschen waren.
Serum E: T 115 abgesättigt mit Hammelerythrocyten, die mit durch Autoklavieren gewonnenem Antigen beladen waren.

Die mit diesen Seren durchgeführten Reaktionen zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2 O-Widal und indirekte Haemagglutination

	St. 7 lebend 0–4,12	St. 72 lebend 0–1,9,12	St. 248 lebend 0–4,5,12	St. 248 56°C 0–4,(5),12	St. 248 120°C 0–4,(5),12	St. 248 an Ery. 0–4,(5),12
Serum A	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
Serum B	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
Serum C	ϕ	ϕ	800	400	ϕ	ϕ
Serum D	ϕ	ϕ	50	50	ϕ	ϕ
Serum E	ϕ	ϕ	1600	800	ϕ	ϕ

Serumanfangsverdünnung: 1 : 50
lebend : Suspension aus lebenden Bakterien.
56°C : Suspension aus 1 Std. auf 56°C erhitzten Bakterien.
120°C : Suspension aus 1 Std. auf 120°C erhitzten Bakterien.
St. 248 an Ery: indirekte Haemagglutination mit Hammelerythrocyten, beladen mit Antigen von St. 248.

Wie dieser Tabelle zu entnehmen ist, hat die Absättigung mit St. 248 lebend (Serum A) bzw. St. 248 1 Std. 56°C (Serum B) zu einer Absorption

aller Antikörper des Serums T 115 geführt, da sich mit den O-Antigen 1, 4, 5 und 12 der verschiedenen Stämme keine Reaktion ergibt. Durch Absättigung mit St. 248 1 Std. 120°C (Serum C) sind die Antikörper gegen O-1, 4 und O-12 eliminiert worden, nicht dagegen die Antikörper gegen O-5 wie der Ansatz mit lebenden bzw. 1 Std. auf 56°C erhitzten Bakterien zeigt, mit denen sich ein Titer von 1 : 800 bzw. 1 : 400 ergibt. Mit O-Antigen 5 des autoklavierten Stammes tritt dagegen keine Reaktion auf. Zusätzliche Waschung des zur Absättigung verwendeten, autoklavierten Stammes (Serum D) führte im Prinzip zum gleichen Ergebnis, nur sind die Titer gegen O-Antigen 5 wesentlich niedriger. Durch Absättigung mit an Erythrocyten angelagerten Antigen von St. 248 (Serum E) lassen sich alle Antikörper gegen O-1, 4 und O-12 entfernen, nicht dagegen Antikörper gegen O-5. Wiederum sind O-5-Antikörper mit dem lebenden und mit dem 1 Std. auf 56°C erhitzten Stamm (Titer 1 : 1600 bzw. 1 : 800) nachweisbar, nicht dagegen mit den autoklavierten Bakterien. Die indirekte Haemagglutination mit Antigen von St. 248 fällt mit allen verwendeten Seren negativ aus. Serum A und B sind antikörperfrei und somit ohne Bedeutung. Die O-5-Antikörper der Seren C, D und E führen jedoch trotz einer maximalen Titerhöhe von 1 : 1600 gegen O-5-Antigen lebender Para-B-Bakterien mit demselben, durch Autoklavieren gewonnenen Antigen zu keiner Reaktion.

Um ein reines O-5-Serum zu erhalten, wurde Serum T 115 zunächst mit St. 7 S. paratyphi B var. odense (O-4, 12) abgesättigt. Da sich aber sowohl in Widal-Reaktionen als auch in indirekten Haemagglutinationen nachweisen ließ, daß sich danach noch O-1- oder O-12-Antikörper im Serum befanden, wurde Serum T 115 daraufhin mit St. 7 und St. 72 S. dar es salaam (O-1, 9, 12) gleichzeitig abgesättigt. Das so abgesättigte Serum wurde als T 115 a bezeichnet. Mit T 115 a gab es in der Bakterienagglutination nach Widal folgende Ergebnisse (Tabelle 3):

Tabelle 3 O-Widal

	St. 7 lebend 0–4,12	St. 72 lebend 0–1,9,12	St. 64 lebend 0–1,9,12	St. 248 lebend 0–4,5,12	
Serum T 115 a	ϕ	ϕ	ϕ	800	
	St. 5 120°C 0–4,(5),12	St. 103 120°C 0–1,4,(5),12	St. 209 120°C 0–4,(5),12	St. 248 120°C 0–4,(5),12	
Serum T 115 a	ϕ	ϕ	ϕ	50	

Serumanfangsverdünnung: 1 : 50
lebend = Suspension aus lebenden Bakterien.
120°C = 1 Std. auf 120°C erhitzte Bakteriensuspension.

Tabelle 3 zeigt, daß sich im abgesättigten Serum T 115 a keine Antikörper mehr gegen O-1, 4 und 12 befinden, da sich mit den entsprechenden Antigenen keine Reaktion ergibt. Mit dem O-5-Antigen des lebenden Stammes 248 (mit dem das Serum T 115 hergestellt wurde) ergibt sich ein Titer von 1 : 800. Mit den autoklavierten Bakterien dagegen beträgt er nur noch 1 : 50. Mit den O-5-Antigenen anderer, autoklavierter Stämme ist die Reaktion schließlich negativ. Auch in der indirekten Haemagglutination (Tabelle 4) erwies sich Serum T 115 a frei von O-1, 4 und 12 Antikörpern. Das somit reine O-5-Serum ergab mit Antigenen verschiedener O-4, 5-Stämme, die durch Autoklavieren gewonnen und an Hammelerythrocyten angelagert wurden, keine Reaktion.

Tabelle 4 Indirekte Haemagglutination

	St. 7 0–4,12	St. 72 0–1,9,12	St. 248 0–4,(5),12	St. 209 0–4,(5),12	St. 5 0–4,(5),12
Serum T 115 a	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ

Serumanfangsverdünnung: 1 : 50

Teil II

VERSUCHE ZUR ANLAGERUNG DES O-5-ANTIGENS AN HAMMELERYTHROCYTEN

In Teil II wurde nach einer Methode gesucht, das O-5-Antigen an Hammelerythrocyten anzulagern. Da die indirekte Haemagglutination in Teil I negativ war, wurde nacheinander geprüft, ob dies auf einen Mangel an Antikörpern oder an Antigen zurückzuführen ist. Da unter den im Institut vorhandenen O-4, 5-Seren keine mit hohem O-5-Titer zu finden waren, wurde versucht, solche durch Immunisierung von Kaninchen zu gewinnen.

A. Serumversuche

Auf der Suche nach einem Serum mit hohem O-5-Antikörper-Gehalt wurden die O-4, 5-Seren T 19b, T 45 und T 46 im O-Widal geprüft. Sie hatten gegen lebende O-4, 5, 12-Stämme einen Titer von 1 : 1280 bzw. 1 : 320 und 1 : 640. Nach Absättigung mit St. 7 S. paratyphi B var. odense und St. 72 S. dar es salaam hatte Serum T 19 b einen O-5-Titer gegen St. 248 lebend (O-4, 5, 12) von nur noch 1 : 100. Die Seren T 45 und T 46 erwiesen sich nach der Absättigung als leer.

Im weiteren wurde versucht, durch Kaninchenimmunisierung neue O-5-Seren zu gewinnen. Um Kaninchen mit möglichst geringem primär vorhandenem Antikörpergehalt herauszufinden, wurden 21 Tiere (T 1- T 21) untersucht. Bei T 1 bis T 17 handelte es sich um die übliche, gekreuzte Rasse, T 18 - T 21 gehörten einer Zuchtrasse an ("Blaue Wiener"). Als Untersuchungsmethoden dienten die Widal-Reaktion und die indirekte Haemagglutination. Dabei wurden jeweils folgende Stämme verwendet:

Gruppe B: St. 5 O-4, 5, 12
Gruppe B: St. 248 O-4, 5, 12
Gruppe C: St. 34 O-6, 7
Gruppe D: St. 72 O-1, 9, 12

Für die Widal-Reaktion wurden lebende Aufschwemmungen benutzt, das

Antigen für die indirekte Haemagglutination wurde durch Autoklavieren (1 Std. 120°C) gewonnen. Bei diesen Voruntersuchungen ergab sich folgendes:

Die Bakterienagglutination fiel bei allen 21 Tieren negativ aus. Bei der indirekten Haemagglutination fanden sich bei den meisten Tieren positive Serumkontrollen, d.h. Antikörper gegen Hammelerythrocyten. Lediglich bei 3 Tieren (T 18, T 20 und T 21) war die Serumkontrolle negativ, in der indirekten Haemagglutination ergaben diese Seren lediglich mit St. 5 eine Reaktion (Titer: 1 : 200, 1 : 50, 1 : 50). Bei weiteren 4 Tieren (T 2, T 3, T 12, T 15) mit schwach positiver Serumkontrolle gab es nach Absättigung mit Hammelerythrocyten in der indirekten Haemagglutination entweder keine (T 2 und T3) oder schwache Reaktionen bis 1 : 40 (T 12 und T 15). Bei den Tieren T 8, T 9, T 10 und T 19 ließen sich positive Reaktionen in der indirekten Haemagglutination auf schwache, aber deutlich positive Serumkontrollen zurückführen. Die restlichen Tiere (10 von 21 Tieren) waren wegen stark positiver Serumkontrolle von vornherein ungeeignet und wurden daher nicht weiter untersucht.

Die folgenden Tiere wurden immunisiert:

T 9, T 10, T 15 mit St. 5 S. paratyphi B var. java O-4, 5, 12
T 18 mit St. 103 S. abony 74 O-1, 4, 5, 12
T 19, T 20 mit St. 209 S. typhimurium 1074 O-4, 5, 12
T 21 mit St. 151 S. coeln O-4, 5, 12

Zur Immunisierung wurden alle Stämme 1 Std. auf 56°C erhitzt, jedes Tier erhielt 7 Injektionen.

Nach dieser Immunisierung ergaben sich bei den Seren T 9, T 10, T 15 die in Tabelle 5 angeführten Titer in der Bakterienagglutination.

Tabelle 5 O-Widal

	St. 23 lebend 0–1,4,12	St. 64 lebend 0–1,9,12	St. 248 lebend 0–4,5,12	St. 248 120°C 0–4,(5),12	St. 209 120°C 0–4,(5),12
Serum T 9	ϕ	ϕ	320	ϕ	ϕ
Serum T 10	40	ϕ	640	ϕ	ϕ
Serum T 15	400	200	800	400	1600

Serumanfangsverdünnung: 1 : 40
lebend = Suspension aus lebenden Bakterien
120°C = 1 Std. auf 120° erhitzte Bakteriensuspension.

Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß die Kaninchen T 9, T 10 und T 15 nur geringe Antikörpermengen entwickelt haben. T 9 hat ausschließlich, T 10 vorwiegend Antikörper gegen O-5 gebildet. Die Antikörper von Serum T 15 sind vorwiegend gegen O-1, 12 und 4 gerichtet. Als abgesättigtes O-5-Serum zeigte es gegen lebende O-4, 5, 12-Stämme noch einen Titer von 1 : 40.

Ergebnislos verlief die Immunisierung der Tiere T 18 - T 21. In diesen Seren ließen sich weder O- noch H-Antikörper gegen die Stämme, mit denen die Tiere immunisiert worden waren, nachweisen. Sämtliche Seren wurden wegen der niedrigen bzw. fehlenden O-5-Titer nicht weiter verwendet.

Mit Hilfe der Elektrophorese wurde versucht, eine Erklärung für die schlechte Antikörperbildung der immunisierten Kaninchen zu finden. Dabei ergab sich jedoch kein Hinweis auf fehlende oder verminderte γ-Globulin-Bildung der Tiere. Ebensowenig ließ sich entnehmen, weshalb die "Blauen Wiener" (T 18 - T 21) keine Antikörper produzierten.

Die folgenden Kaninchen wurden ohne vorherige Untersuchung immunisiert:

T 133 mit St. 13 S. typhimurium O-Form 3173 0-4, 5, 12

T 134 mit St. 248 S. paratyphi B O-Form 0-4, 5, 12

Zur Immunisierung wurde von St. 13 eine lebende Suspension verwendet, St. 248 wurde in 0,3 % Formaldehyd aufgeschwemmt. Beide Tiere erhielten 4 Injektionen. Die gewonnenen 0-4, 5, 12-Immunseren zeigten im O-Widal gegen lebende 0-4, 12- und 0-4, 5, 12-Stämme die in Tabelle 6 angeführten Titer.

Tabelle 6 O-Widal

	St. 11 lebend 0–4,12	St. 22 lebend 0–4,12	St. 13 lebend 0–4,5,12	St. 248 lebend 0–4,5,12	
Serum T 133	3200	3200	6400	6400	
Serum T 134	3200	1600	6400	3200	

lebend = Suspension aus lebenden Bakterien

Um festzustellen, ob sich in diesen Seren in der indirekten Haemagglutination "falsche" nicht auf O-Antigen-Antikörper-Verbindung zurückzuführende Reaktionen nachweisen lassen, wurde die indirekte Haemagglutination (Tabelle 7) mit Salmonellenstämmen verschiedener Gruppen durchgeführt, die die Antigene 0-1, 4, 5 und 12 nicht besaßen, so daß spezifische O-Agglutinationen nicht zu erwarten waren. Da stark positive Serumkontrollen zeigten, daß sich in beiden Seren Antikörper gegen Hammelerythrocyten befanden, wurden sie zuvor mit Hammelerythrocyten abgesättigt. Die Antigene wurden durch Autoklavieren von den folgenden Stämmen gewonnen:

Gruppe C_1: St. 46 0-6,7
Gruppe C_2: St. 50 0-6,8
Gruppe E_1: St. 76 0-3,10,26
Gruppe E_2: St. 84 0-3,15
Gruppe I: St. 96 0-16

Tabelle 7

	St. 46 0–6,7	St. 50 0–6,8	St. 76 0–3,10,26	St. 84 0–3,15	St. 96 0–16
Serum T 133	80	320	160	160	80
Serum T 134	40	160	40	40	40

Serumkontrollen negativ

Tabelle 7 zeigt, daß bei beiden Seren T 133 und T 134 "falsche" Reaktionen in z. T. beträchtlicher Stärke auftraten. Serum T 133 zeigt dabei durchweg höhere Titer als Serum T 134.

Um reine 0-5-Seren zu erhalten, wurden die Seren T 133 und T 134 mit St. 23 S. budapest (0-1, 4, 12) abgesättigt. Dieser Stamm hatte sich so reich an den Antigenen 0-1, 4 und 12 erwiesen, daß sich mit ihm die entsprechenden Antikörper restlos aus dem Serum entfernen ließen. Die Doppelabsättigung mit St. 7 (0-4, 12) und St. 72 (0-1, 9, 12) wurde damit unnötig.

Die abgesättigten Seren wurden als T 133 a und T 134 a bezeichnet. Die Widal-Reaktion (Tabelle 8) brachte folgende Ergebnisse:

Tabelle 8 O-Widal

	St. 7 + St. 11 lebend 0–4,12	St. 23 lebend 0–1,4,12	St. 72 lebend 0–1,9,12	St. 13 lebend 0–4,5,12	St. 248 lebend 0–4,5,12	St. 13 + St. 248 120°C 0–4,(5),12
Serum T 133 a	ϕ	ϕ	ϕ	3200	1600	ϕ
Serum T 134 a	ϕ	ϕ	ϕ	800	800	ϕ

Serumanfangsverdünnung: 1 : 50
lebend = Suspension aus lebenden Bakterien.
120°C = 1 Std. auf 120°C erhitzte Bakteriensuspension.

Die linke Hälfte von Tabelle 8 zeigt, daß die Seren T 133 a und T 134 a frei von Antikörpern gegen 0-1, 4 und 12 sind. Aus der rechten Hälfte sind die Titer gegen O-Antigen 5 zu ersehen. Da Serum T 133 a höhere Titer als Serum T 134 a aufweist (1 : 3200 gegenüber 1 : 800), wurde es in den folgenden Versuchen vorwiegend verwendet. Es fällt auf, daß Serum T 133 a trotz eines Titers von 1 : 3200 und 1 : 1600 gegen die lebenden Aufschwemmungen von St. 13 bzw. St. 248 diese Stämme nach Autoklavieren nicht mehr agglutiniert. Das im Prinzip gleiche Ergebnis zeigte sich mit Serum T 134 a. Mit den Seren T 133 a und T 134 a wurde nun versucht, in der indirekten Haemagglutination (Tabelle 9) die Anlagerung eines geringen, durch Autoklavieren nicht zerstörten Anteils von 0-5 nachzuweisen.

Tabelle 9 **Indirekte Haemagglutination**

	St. 23 0–1,4,12	St. 72 0–1,9,12	St. 13 0–4,(5),12	St. 248 0–4,(5),12	
Serum T 133 a	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	
Serum T 134 a	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	

Serumanfangsverdünnung: 1 : 20
Die Antigene wurden durch Autoklavieren gewonnen.

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, ist die Anlagerung von autoklaviertem 0-5-Antigen nicht nachweisbar, da die Reaktion mit St. 13 und St. 248 negativ ausfällt. Diese Ergebnisse entsprechen im übrigen denen von Tabelle 8, bei der sich im O-Widal mit autoklavierten Bakterien von 0-4, 5-Stämmen ebenfalls keine Reaktion und damit kein Anhaltspunkt für erhalten gebliebenes O-Antigen 5 ergibt. Tabelle 9 zeigt ferner, daß die Seren T 133 a und T 134 a auch in der indirekten Haemagglutination frei von 0-1, 4 und 12-Antikörper sind. Alle diese negativen Reaktionen werden gleichzeitig als Nachweis dafür gewertet, daß bei beiden abgesättigten Seren in der indirekten Haemagglutination mit Stämmen der Gruppen B und D keine positiven Reaktionen durch das bereits beschriebene unspezifische Antigen auftreten.

B. Versuche mit verschiedenen Antigenextraktionen

1) Antigenextraktion durch phys. NaCl-Lösung

2) Antigenextraktion durch aqua dest.

Mit diesen beiden Methoden wurde versucht, Antigen von St. 13 S. typhimurium und St. 248 S. paratyphi B zu gewinnen. Die erhaltenen Extrakte wurden nach der gewohnten Technik der indirekten Haemagglutination mit Erythrocyten inkubiert und dann mit "0-5"-Serum T 133 a angesetzt. Aus dem negativen Ausfall aller Reaktionen durfte man schließen, daß keine der beiden Extraktionsmethoden geeignet war, anlagerungsfähiges O-5-Antigen zu liefern.

3) Antigenextraktion durch Phenol in der Kälte.

Zunächst wurden mit Hilfe der indirekten Haemagglutination die Antigene der phenolischen Phase untersucht. Dabei waren lediglich geringe Mengen von O-Antigen 1, 4 und 12 nachweisbar, O-5-Antigen ließ sich nicht feststellen. Bei Untersuchung der Antigene der wässrigen Phase, die vorwiegend aus Glycoproteiden bestehen, konnte neben den O-Antigenen 1, 4 und 12 auch das O-Antigen 5 nachgewiesen werden. In weiteren Vorversuchen wurden geeignete Verdünnungen von Serum und Antigen ermittelt, wobei sich eine Antigenverdünnung von 1 : 4 und eine Serumverdünnung von 1 : 100 günstig erwies. Diese Verdünnungen wurden bei allen Versuchen mit phenolextrahierten Antigenen angewendet.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der indirekten Haemagglutination mit verschiedenen phenolextrahierten Antigenen der wässrigen Phase und Serum "0-5".

Tabelle 10 Indirekte Haemagglutination

Antigene unerhitzt	St. 7/ H_2O 0–4,12	St. 23/ H_2O 0–1,4,12	St. 72/ H_2O 0–1,9,12	St. 13/ H_2O 0–4,5,12	St. 248 H_2O 0–4,5,12
Serum T 133 a	ϕ	ϕ	ϕ	>1600	800
Antigene 1 Std. auf 120°C erhitzt					
Serum T 133 a	ϕ	ϕ	ϕ	>1600	ϕ

St./H_2O = phenolextrahiertes Antigen der wässrigen Phase.
T 133 a = abgesättigtes 0-5-Serum.

Wie Tabelle 10 zu entnehmen ist, ist die indirekte Haemagglutination mit dem unerhitzten, phenolextrahierten Antigen von St. 13 und St. 248 positiv ausgefallen. Die Reaktion mit dem 1 Std. auf 120°C erhitzten Antigen von St. 13 ist ebenfalls positiv, die mit St. 248 dagegen negativ, das Antigen ist durch Erhitzen offenbar zerstört worden. Die positiven Ergebnisse mit unerhitztem Antigen lassen sich nur auf O-Antigen 5 zurückführen: das zeigt der negative Ausfall der indirekten Haemagglutination mit den phenolextrahierten Antigenen O-1, 4 und 12 der Kontrollstämme 7, 23 und 72 (Die indirekte Haemagglutination der Kontrollstämme mit ihren homologen Seren war positiv). Da das phenolextrahierte Antigen von St. 13 durch Autoklavieren offenbar nicht zerstört wurde, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um diese Vermutung zu bestätigen: (Das dafür verwendete Antigen von St. 13 unterschied sich ebenso wie das phenolextrahierte von dem früher verwendeten Antigen lediglich durch das höhere Alter der Ausgangskulturen) Zunächst wurden auch mit Serum T 134 a die Reaktionen mit St. 13 durchgeführt. Dabei ergab sich mit St. 13/H_2O in der indirekten Haemagglutination ein Titer von 1 : 800, mit dem autoklavierten Antigen einer von 1 : 1600.

In der Annahme, daß sich das beim Erhitzen auf 120°C nicht zerstörte

O-5-Antigen von St. 13 durch Autoklavieren ebenfalls extrahieren lasse, wurde versucht, mit diesem Extrakt die O-5-Antikörper des Serums T 133 a zu blockieren. Dies würde sich in der Hemmung der indirekten Haemagglutination (Tabelle 11) mit O-Antigen-5-beladenen Erythrocyten (phenolextrahiertes, autoklaviertes Antigen der wässrigen Phase) zeigen. Sollte eine Hemmung eintreten, so wäre das gleichzeitig ein Beweis dafür, daß die reagierenden Anteile der beiden auf verschiedene Weise gewonnenen Antigene serologisch identisch sind.

Tabelle 11 Haemagglutinations-Hemmungstest

St. 13 Antigenverdünnung 1:	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
AG 13/ H_2O 1 Std. 120°C an Ery — Serum T 133 a	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	+	++	+++	+++
AG 13/ H_2O 1 Std. 120°C an Ery — Serum T 134 a	ϕ	ϕ	ϕ	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Das Antigen der Verdünnungsreihe wurde durch Autoklavieren aus St. 13 gewonnen.
AG 13/H_2O 1 Std. 120°C = phenolextrahiertes, 1 Std. auf 120°C erhitztes Antigen der wässrigen Phase von St. 13 in Verdünnung 1 : 4 an Erythrocyten angelagert.
Serum T 133 a, T 134 a = „0-5"-Serum in konstanter Verdünnung 1 : 100.

Aus der bei hohen Antigenkonzentrationen von St. 13 negativen indirekten Haemagglutination ist zu sehen, daß die Serumantikörper abgeblockt worden sind. Mit zunehmender Antigenverdünnung wird die indirekte Haemagglutination in steigendem Maße positiv, bedingt durch freie, nicht mehr abgeblockte Antikörper. Die Ursache der verschieden breiten Hemmzonen mit den Seren T 133 a und T 134 a ist wohl in Konzentrationsunterschieden des autoklavierten Antigens von St. 13 zu suchen, da dieses zwar auf die gleiche Weise, jedoch in 2 verschiedenen Arbeitsgängen hergestellt worden war.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, mit Absättigungen, O-Bakterienagglutinationen und indirekten Haemagglutinationen weiter zu sichern, daß ein Teil des O-Antigens 5 von St. 13 durch Autoklavieren nicht zerstört

wird. Hierzu wurden die O-4,5,12-Seren T 133 und T 134 mit autoklavierten (1 Std. 120°C) Bakterien von St. 13 abgesättigt (Bezeichnung der so abgesättigten Seren T 133 b und T 134 b); der Absättigungsvorgang wurde mit verschiedenen Antigenen in der indirekten Haemagglutination kontrolliert (Tabelle 12). Außerdem wurde mit den O-5-Seren T 133 a und T 134 a eine Widal-Reaktion mit autoklavierten Bakterien von St. 13 und eine indirekte Haemagglutination mit dem durch Autoklavieren gewonnenen Antigen desselben Stammes angesetzt (Tabelle 13). Dabei stammten die autoklavierten Bakterien für die Absättigung und für den O-Widal und das nach Zentrifugieren daraus gewonnene Antigen für die indirekte Haemagglutination aus ein und derselben Bakterienabschwemmung. Die Bakterien für diese Suspensionen wurden zwar vom gleichen Blutagar abgeimpft, für jede der beiden Serumversuchsreihen wurden die Suspensionen aber gesondert hergestellt.

Tabelle 12 Indirekte Haemagglutination

	St. 23 0–1,4,12	St. 72 0–1,9,12	St. 13 0–4,5,12	St. 13/ H_2O 0–4,5,12	St. 13/ H_2O/ 120°C 0–4,(5),12
Serum T 133 b	ϕ	ϕ	ϕ	400	ϕ
Serum T 134 b	ϕ	ϕ	ϕ	200	ϕ

Serumanfangsverdünnung: 1 : 100
St. 23, 72, 13: Antigene durch Autoklavieren gewonnen.
St. 13/H_2O: phenolextrahiertes Antigen von St. 13 aus der wässrigen Phase, Verdünnung 1 : 4
St. 13/H_2O/120°C: das gleiche Antigen 1 Std. auf 120°C erhitzt, Verdünnung 1 : 4.

Tabelle 13 O-Widal indirekte Haemagglutination

	St. 13 120°C 0–4,(5),12	Antigen von St. 13 an Ery 0–4,(5),12
Serum T 133 a	100	1600
Serum T 134 a	ϕ	1600

Serumanfangsverdünnung: 1 : 50
St. 13 120°C: 1 Std. auf 120°C erhitzte Bakteriensuspension.
Antigen von St. 13 an Ery: Mit Antigen von St. 13 beladene Erythrocyten, Antigen durch Autoklavieren gewonnen, identisch mit Antigen von St. 13 in Tabelle 12.

Wie die negativen Reaktionen der indirekten Haemagglutination mit St. 23 und St. 72 in Tabelle 12 zeigen, sind durch die Absättigung mit autoklavierten Bakterien von St. 13 alle O-1, 4 und 12 Antikörper aus dem Serum entfernt worden. Zusätzlich wurden aber auch O-5-Antikörper absorbiert: die indirekte Haemagglutination mit phenolextrahiertem, autoklaviertem Antigen von St. 13 ist negativ, der Titer mit phenolextrahiertem, nicht erhitztem Antigen dieses Stammes gesunken (vergleiche die indirekte Haemagglutination mit denselben Antigenen in Tabelle 10). Diese Titersenkung ließ sich auch im O-Widal mit St. 13 lebend nachweisen. Die Titer der Seren T 133 b und T 134 b betrugen nur noch 1 : 800 und 1 : 200 gegenüber 1 : 3200 bzw. 1 : 800 der Seren T 133 a und T 134 a in Tabelle 8. Nach Tabelle 13 ergeben beide Seren in der indirekten Haemagglutination mit dem durch Autoklavieren gewonnenen Antigen von St. 13 stark positive Reaktionen, was sich nur auf angelagertes O-5-Antigen zurückführen läßt. Das Ergebnis der indirekten Haemagglutination wird in der Widal-Reaktion mit Serum T 133 a bestätigt. Daß die entsprechende Reaktion mit Serum T 134 a negativ ausgefallen ist, kann man auf den geringeren O-5-Antikörper-Gehalt dieses Serums zurückführen.

4) Antigenextraktion durch Kochen

Die durch Kochen (1 Std. 100°C) extrahierten Antigene der Stämme 7, 72 13 und 248 wurden in der indirekten Haemagglutination mit den "O-5"-Seren T 133 a und T 134 a angesetzt. Mit diesen Seren wurde außerdem zum Vergleich ein O-Widal mit den 1 Std. auf 100°C erhitzten Bakterien der oben genannten Stämme durchgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 14 O-Widal und indirekte Haemagglutination

	St. 7 0–4,12	St. 72 0–1,9,12	St. 13 0–4,(5),12	St. 248 0–4,(5),12	
Serum T 133 a	ϕ	ϕ	12 800	6 400	indirekte Haemagglutination
Serum T 134 a	ϕ	ϕ	6 400	3 200	
Serum T 133 a	ϕ	ϕ	1 280	640	O-Widal
Serum T 134 a	ϕ	ϕ	80	80	

Serumanfangsverdünnung in der indirekten Haemagglutination: 1 : 100
Serumanfangsverdünnung beim O-Widal: 1 : 20.

Aus den Ergebnissen der indirekten Haemagglutination und der Widal-Reaktion (Tabelle 14) ist zu sehen, daß mit den O-Antigenen 1, 4 und 12 keine Reaktion auftritt. Wie die O-Bakterienagglutinationen mit St. 13 und St. 248 zeigen, ist das O-5-Antigen gegenüber Kochen widerstandsfähiger als gegenüber Autoklavieren, wie die bisherigen Versuche zeigten. Die O-5-Titer der Seren T 133 a und T 134 a fallen in der indirekten Haemagglutination mit diesen Stämmen sehr hoch aus. Sie sind wesentlich höher als im Widal mit lebenden Bakterien (siehe Tabelle 8).

DISKUSSION

Wie sich bei den Untersuchungen über die Thermolabilität des O-5-Antigens zeigte, blieb dieses nahezu vollständig erhalten, wenn es 1 Std. der Temperatur von 56°C ausgesetzt wurde. Bei Absättigungsversuchen ließ sich keine Schwächung der agglutininbindenden Kraft feststellen; wie aus Widalreaktionen hervorging, war die agglutinable Fähigkeit nur wenig vermindert. Zu ähnlichen Ergebnissen waren Kauffmann (1936 b) und Felix (1952 a) gekommen. Kauffmann fand beide Anteile des von ihm damals als komplex angenommenen O-5-Antigens nach 1 Std. Erhitzen auf 60°C unverändert, Felix stellte nach dieser Behandlung eine leichte Reduzierung der agglutinablen und agglutinogenen Eigenschaften fest.

Auf Grund der ersten Ergebnisse von Versuchen mit autoklaviertem O-5-Antigen mußte man zu dem Schluß kommen, daß dieses durch 1-stündiges Erhitzen auf 120°C völlig zerstört wird. Hinsichtlich der agglutininbindenden Fähigkeit ließ sich das durch Absättigungen zeigen: in dem dafür verwendeten O-1, 4, 5, 12-Serum blieben nach Absättigung mit autoklavierten O-1, 4, 5, 12-Bakterien ebensoviele O-5-Antikörper zurück, wie nach Absättigung mit lebenden Bakterien, die kein O-5-Antigen besaßen. (Nach 3-maligem Auswaschen zeigten die autoklavierten Bakterien allerdings eine deutliche Absorption der O-5-Antikörper. Man könnte sich vorstellen, daß durch diese Behandlung tiefer liegendes, unzerstörtes O-5-Antigen freigewaschen worden ist und so zur O-5-Antikörper-Bindung führte.) Die Zerstörung der agglutinablen Fähigkeit ließ sich in der Bakterienagglutination nachweisen: mit verschiedenen Seren, die mit lebenden Bakterien O-5-Titer bis zu 3200 aufwiesen, ergab sich bei Verwendung autoklavierter, O-5-haltiger Bakterien keine Reaktion.

Es ließ sich auch zeigen, daß durch Autoklavieren einer Bakteriensuspension das O-5-Antigen nicht, wie etwa das Vi-Antigen von S. typhi, nur in

Lösung gebracht wird und sich so dem direkten Nachweis an den Bakterien entzieht: durch Absättigung mit Erythrocyten, die mit solcherart in Lösung gegangenem Antigen von O-1, 4, 5, 12 enthaltenden Bakterien beladen waren, ließen sich zwar alle O-1, 4, 12-Antikörper aus dem verwendeten Immunserum entfernen, jedoch keine O-5-Antikörper, wie ein Titervergleich mit demselben O-5-Serum lehrt, das mit Bakterien ohne O-5-Antigen abgesättigt wurde. Diese Ergebnisse wurden auch durch indirekte Haemagglutinationen mit verschiedenen abgesättigten O-5-Seren und in gleicherweise beladenen Erythrocyten bestätigt, die sämtlich negativ verliefen. Daß die eben beschriebenen Ergebnisse auf eine Zerstörung von O-5- zurückzuführen sind, und nicht etwa auf die Unmöglichkeit, solcherart gelöstes O-5-Antigen anzulagern, zeigen die folgenden Versuche mit St. 13. Daß das O-5-Antigen zerstört und nicht nur ausgewaschen wird, entspricht im übrigen den Erwartungen, da ja die agglutininbindende Fähigkeit von O-5 durch Autoklavieren des Bakteriensediments, im Gegensatz zum Vi-Antigen, aufgehoben wird.

Etwas abweichende Resultate ergaben sich mit Bakterien bzw. Antigen von älteren Ausgangskulturen von St. 13. Sowohl mit autoklaviertem, durch Phenolextraktion gewonnenem Glycoproteidantigen, als auch mit durch Autoklavieren extrahiertem Rohantigen ließ sich in der indirekten Haemagglutination angelagertes, unzerstörtes O-5-Antigen nachweisen. Haemagglutinations-Hemmungstests zeigten, daß die agglutininbindende Kraft des gelösten, durch Autoklavieren gewonnenen Antigens zumindest teilweise erhalten geblieben war. Auch an den autoklavierten Bakterien selbst waren Reste unzerstörten O-5-Antigens zu finden: die Widalreaktion eines reinen O-5-Serums mit derartig behandelten Bakterien war bis zu einem Titer von 1 : 100 positiv, bei Absättigungen mit autoklavierten Bakterien war eine deutliche, agglutininbindende Fähigkeit des O-5-Antigens festzustellen.

Betrachtet man die Ergebnisse mit diesem Stamm unter anderem Aspekt, so ist man versucht, die Hypothese Kauffmanns (1936 b) von der komplexen Natur des O-5-Antigens nochmals aufzugreifen: auffallenderweise werden alle Reaktionen mit autoklaviertem O-5-Antigen, nämlich die in-

direkte Haemagglutination mit dem phenolextrahierten Glycoproteidantigen und die mit dem Rohantigen, wie auch die Widal-Reaktion mit autoklavierten Bakterien, die mit reinem O-5-Serum deutlich positive Reaktionen ergaben, nach Absorption eines Teiles der O-5-Antikörper durch autoklavierte Bakterien negativ; die indirekte Haemagglutination mit unerhitztem, phenolextrahiertem Antigen blieb mit derart abgesättigtem Serum positiv, der Titer ist jedoch deutlich gesenkt. Aus diesen Ergebnissen könnte man herauslesen, daß spezielle Antikörper gegen thermostabiles O-5-Antigen gebildet werden, die sich durch thermostabiles (autoklaviertes) Antigen selektiv aus dem Serum entfernen lassen. Die einfachere, zwanglosere Erklärung, daß bei Verminderung der O-5-Antikörper natürlich zuerst die Reaktionen mit ebenfalls vermindertem, nämlich autoklaviertem Antigen negativ ausfallen, während sie bei hohem O-5-Antigen-Gehalt (O-5-Antigen unerhitzt) noch positiv sind, scheint hier aber doch angebrachter.

Die zuletzt beschriebenen Resultate der Versuche mit St. 13 stimmen auch mit denen Kaufmanns (1947) überein, der nach 2-stündigem Autoklavieren bei 125°C die Bakterien-Agglutinabilität durch O-5 zwar geschwächt, aber noch deutlich nachweisbar fand (Titer von 1 : 320 mit erhitztem gegenüber 1 : 1280 mit unerhitztem O-5-Antigen). Auch agglutininbindende Eigenschaften des so behandelten O-5 konnte er noch nachweisen. Lediglich die agglutinogene Fähigkeit war völlig verschwunden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stellt es aber keineswegs die Regel dar, daß das O-5-Antigen nach Autoklavieren noch teilweise erhalten ist, dies ist im Gegenteil eher die Ausnahme. Im allgemeinen kann man damit rechnen, daß Autoklavieren zu seiner vollständigen Zerstörung führt.

Die Widerstandsfähigkeit des O-5-Antigens gegenüber Kochen (1 Std. 100°C) wurde lediglich in der Bakterienagglutination nach Widal geprüft. Dabei ließ sich bei beiden verwendeten Stämmen erhalten gebliebenes O-5-Antigen nachweisen; auffallenderweise ergaben sich mit dem gekochten O-5-Antigen von St. 13, das beim Autoklavieren teilweise erhalten blieb, beinahe ebenso hohe O-5-Titer, wie bei Verwendung lebender Bakterien. Mit den gekochten Bakterien von St. 248, dessen O-5-Antigen

durch Autoklavieren völlig zerstört wurde, ergaben sich dagegen nur schwache Reaktionen.

Im Vergleich dazu fanden Felix und Kauffmann im Laufe ihrer Untersuchungen folgendes: aus Tabelle I der Arbeit von Felix und Pitt (1936) geht hervor, daß O-5 nach 2 1/2-stündigem Erhitzen auf 100°C völlig verschwunden ist. Kauffmann (1936 b) fand nach 2-stündigem Kochen einen "thermolabilen" Teil zerstört, einen "thermostabilen" Teil dagegen erhalten. Nach seinen Ergebnissen von 1947 war die agglutinable Fähigkeit von O-5 nach dieser Behandlung überhaupt nicht, die agglutinogene und agglutininbindende Eigenschaft nur wenig geschwächt. Es wurden hier ebenfalls Stämme benutzt, deren O-5-Antigen durch Autoklavieren nicht vollständig zerstört wurde! Felix (1952 a) dagegen fand das O-5-Antigen nach 2 1/2-stündigem Kochen in allen 3 Eigenschaften stark reduziert.

Die Ergebnisse über die Thermolabilität des O-5-Antigens - eigene wie die der genannten Autoren - sind nochmals ausführlich dargestellt worden, um zu zeigen, daß sie teilweise erheblich voneinander abweichen. Wie könnten nun diese Resultate auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden?

Ausgehend von den Untersuchungen von Kotelko, Staub und Tinelli (1961), daß das O-5-Antigen durch die O-Acetylgruppen eines Galaktosezuckers determiniert wird, der ein Bestandteil des Moleküls ist, auf dem sich auch die O-Antigene 4 und 12 befinden, darf man annehmen, daß diese esterartig gebundenen Acetylgruppen beim Erhitzen hydrolytisch abgespalten werden. (Gleichzeitig gehen bei dieser Behandlung wahrscheinlich die ganzen, die O-Antigene 4, 5, 12 tragenden Moleküle teilweise in Lösung, was aber für die folgenden Ausführungen von untergeordneter Bedeutung ist.) Die Spaltungsreaktion geht relativ langsam vor sich und führt bis zu einem Gleichgewicht. Erhöhung der Temperatur bringt eine Reaktionsbeschleunigung mit sich, d.h., in der gleichen Zeiteinheit werden bei höherer Temperatur mehr Esterbindungen gespalten als bei tieferer. Dementsprechend bleiben dann weniger bzw. mehr ungespaltene Verbindungen, d.h. O-5-Antigene, erhalten. Dies hängt aber nicht nur

von der Temperatur ab, sondern auch von der Menge des in der Reaktion zu spaltenden Materials, anders ausgedrückt, von der Menge des O-5-Antigens, das ein Stamm jeweils ausgebildet hat. Hat ein Stamm viel O-5 entwickelt, so muß bei gleicher Reaktionsgeschwindigkeit und gleicher Zeit mehr O-5-Antigen ungespalten bleiben, als wenn nur wenig O-5 vorhanden war. Da die Reaktion schließlich nur bis zu einem Gleichgewicht geht, mit anderen Worten, da der Quotient $\frac{\text{(Acetyl) (Galaktose)}}{\text{(Acetylgalaktose)}}$ konstant ist, so erhält man bei Erhöhung der Ausgangskonzentration der das O-5-Antigen repräsentierenden Acetylgalaktose in der Reaktion neben vermehrt anfallenden Spaltprodukten auch vermehrt ungespaltenes, d.h. unzerstörtes O-5-Antigen.

Wird die hydrolytische Spaltung mit Alkali oder Säure durchgeführt, so wird die Reaktion, vergleichbar der Verseifung der Fette, stark beschleunigt: Im 1. Fall wird das Hydroxylion als Base mit hoher nucleophiler Kraft wesentlich leichter als Wasser addiert; im 2. Fall ist durch die Protonenanlagerung der nucleophile Angriff durch H_2O erleichtert. Im alkalischen Medium wird zudem das Verseifungsgleichgewicht infolge eines irreversiblen Schrittes in der Reaktion dauernd zugunsten der Hydrolyse verschoben. Auf diese Weise ließe sich die rasche und vollständige Zerstörung des O-5-Antigens durch HCl und NaOH erklären.

Zur Gewinnung von O-4,5-Seren wurden insgesamt 9 Kaninchen immunisiert. Dafür wurden Bakterien von O-4,5-Stämmen in verschiedener Form verwendet, lebend, 1 Std. auf 56°C erhitzt, in 0,3 % Formaldehyd aufgeschwemmt. Wegen der geringen Zahl der Tiere und der verschiedenen Immunisierungsmethoden läßt sich über die Antikörperbildung der Kaninchen kaum etwas aussagen. Es bleibt lediglich festzustellen, daß die Tiere (Gruppe 1), deren Seren mit Hammelerythrocyten keine oder nur geringe positive Reaktionen ergaben, nach der Immunisierung keine oder nur verhältnismäßig wenig Antikörper ausgebildet hatten, während die beiden Tiere (Gruppe 2), deren Seren in der Kontrolle stark positiv waren, sich als sehr gute Antikörperbildner erwiesen. Die Antikörper-

bildung der Tiere von Gruppe 1 scheint zudem von der Rasse abhängig zu sein: die reinrassigen "Blauen Wiener" bildeten keine Antikörper, während bei den anderen Kaninchen doch deutlich nachweisbare Antikörpermengen auftraten. Festzustellen ist schließlich, daß die Tiere der 1. Gruppe mit 1 Std. auf 56°C erhitzten Bakterien immunisiert wurden, während für die Tiere der 2. Gruppe lebende, bzw. in Formaldehyd aufgeschwemmte Bakterien Verwendung fanden.

Bei der Suche nach einer geeigneten Extraktionsmethode für das O-5-Antigen, mit dem Ziel, es an Erythrocyten anzulagern, mußte der Empfindlichkeit von O-5 gegen Hitze, Säure und Alkali Rechnung getragen werden. Aus diesen Gründen wurde zunächst auch auf jegliche Aktivierung des Antigens durch Hitze oder Alkali verzichtet.

Zwei Extraktionsmethoden, mit denen sich das Vi-Antigen von S. typhi leicht in Lösung bringen läßt, waren zur Extraktion von O-5 ungeeignet. Da sich die Polysaccharid-O-Antigene auf diese Weise ebenfalls nicht, oder nur gering herauslösen lassen, kann man in diesem Ergebnis eine Bestätigung dafür sehen, daß das O-5-Antigen eben diesem zuzurechnen ist.

Die Phenolextraktion in der Kälte nach Westphal, Lüderitz und Bister (1952) erwies sich als geeignete Methode, das O-5-Antigen zu extrahieren. Da auf jede, das O-5-Antigen schädigende Behandlung verzichtet wurde, darf man annehmen, daß der Auszug sehr reich an unzerstörtem O-5 war. Trotzdem erhielt man in der indirekten Haemagglutination nur Titer, die nicht oder nur wenig über denen lagen, die sich in der Bakterienagglutination mit lebenden Bakterien ergaben. Da bekannt ist (Neter, Westphal, Lüderitz, Gorzynski 1956), daß man bei Verzicht auf Aktivierung erheblich größere Mengen phenolextrahierter, gereinigter Lipopolysaccharide benötigt, um eine positive indirekte Haemagglutination zu erhalten, als wenn man diese mit Hitze oder NaOH aktiviert, ist dieser Umstand leicht zu erklären. Bei der Extraktion durch Phenol in der Kälte wird zudem von dem vollständigen Antigen, einem Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Komplex, nur das Lipoid (Lipoid B) abgespalten, das Protein bleibt also,

anders als bei der Phenolextraktion in der Wärme, mit der sich die reinen Lipopolysaccharide gewinnen lassen, erhalten. Dieses Protein könnte eine weitere, die Anlagerung hemmende Rolle spielen.

Bei den Extraktionsmethoden durch Autoklavieren (1 Std. 120°C) und durch Kochen (1 Std. 100°C) wird mit Sicherheit ein mehr oder minder großer Teil des O-5-Antigens zerstört. Andererseits führt das Erhitzen aber auch zu einer Aktivierung, so daß das Antigen-Angebot für die Anlagerung nicht so hoch zu sein braucht. Beim Autoklavieren ist die Zerstörung des O-5-Antigens meist so durchgreifend, daß es trotz des Aktivierungseffekts und trotz der hohen Empfindlichkeit der indirekten Haemagglutination meist zu keiner Reaktion mehr kommt. Bei der Extraktionsmethode durch Kochen dagegen wird die teilweise beträchtliche Zerstörung des O-5-Antigens durch die Aktivierung und durch die hohe Empfindlichkeit voll ausgeglichen. Die in der indirekten Haemagglutination mit derartig extrahiertem Antigen erzielten Titer liegen sogar noch wesentlich über denen, die sich in der Bakterienagglutination mit lebenden Bakterien ergaben (1 : 12 800 gegenüber 1 : 3200 bei Serum T 133 a; 1 : 6400 gegenüber 1 : 800 bei Serum T 134 a).

In den im Schrifttum vorhandenen Arbeiten, in denen über die indirekte Haemagglutination mit Salmonellen der B-Gruppe berichtet wird, wird diese Methode für diagnostische Zwecke benutzt, um damit Salmonellosen nachweisen zu können (Neter, Gorzynski, Gino, Westphal, Lüderitz 1956, Sieburth 1957, Neter, Westphal, Lüderitz und Gorzynski 1956), oder die Methode der indirekten Haemagglutination selbst wird unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht (Neter, Westphal, Lüderitz und Gorzynski 1956, Fulthorpe (1954), Freeman, Felsenfeld und Eveland 1955). In keiner dieser Arbeiten ist jedoch mit einem reinen O-5-Serum eine spezielle O-5-Haemagglutination durchgeführt worden, immer wurden Seren verwendet, die meist ein vollständiges Antikörper-Spektrum gegen Salmonellen der Gruppe B besaßen. Es ist daher nicht möglich zu bestimmen, ob die positiven indirekten Haemagglutinationen mit O-1, 4, 5, 12-Stämmen unter anderem auch auf eine Agglutination des O-5-Antigens zurückzuführen sind; auf Grund der verwendeten Extraktionsmetho-

den lassen sich darüber allenfalls Vermutungen anstellen. Bei der Methode von Fulthorpe (1954), der kalte und 100°C heiße O,5 n Trichloressigsäure zur O-Antigen-Extraktion benutzte, dürfte das O-5-Antigen zerstört worden sein. Ebenso in einigen Versuchen von Neter, Westphal, Lüderitz und Gorzynski (1956), bei denen sie Phenol-Wasser-extrahierte Salmonellenlipopolysaccharide mit NaOH aktivierten. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit dürften dagegen Sieburth (1957) und Neter, Gorzynski, Gino, Westphal und Lüderitz (1956), die die Antigene durch 1-stündiges Kochen extrahierten, Mitagglutinationen des O-5-Antigens erhalten haben. Desgleichen Freeman et al. (1955), die die Erythrocyten mit 2 Std. auf 100°C erhitzten Bakteriensuspensionen inkubierten, und Neter, Westphal, Lüderitz und Gorzynski (1956), die in anderen Versuchen unerhitzte und auf 100°C erhitzte, durch Phenolextraktion gewonnene, gereinigte Lipopolysaccharide benutzten.

Von den Extraktionsmethoden, die ein Antigen lieferten, mit dem sich in der indirekten Haemagglutination positive O-5-Reaktionen ergaben, ist die Antigengewinnung durch Autoklavieren für indirekte Haemagglutinationen zum Nachweis von O-5-Antikörper völlig unbrauchbar, da sie wegen Zerstörung des Antigens nur unzuverlässige Ergebnisse liefert. Mit phenolextrahiertem Antigen bietet diese Reaktion ebenfalls keine Vorteile, da sich damit kaum höhere Titer als in der Bakterienagglutination erzielen lassen, von dem Nachteil der komplizierten Antigen-Bereitung ganz abgesehen. Die indirekte Haemagglutination mit gekochtem Antigen ist dagegen als empfindliche Nachweismethode für O-5-Antikörper geeignet, es ergibt sich dabei zudem der Vorzug denkbar einfacher Antigen-Herstellung.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Das Salmonellen-O-5-Antigen des Kauffmann-White-Schemas wurde auf sein Verhalten gegenüber verschiedenen Temperaturen geprüft. Es wurden sowohl das sich in den Bakterien befindliche, als auch das gelöste Antigen untersucht.

Gegenüber einer Temperatur von 56°C erwies sich das O-5-Antigen als nahezu stabil, Kochen (1 Std. 100°C) führte zu teilweiser, Autoklavieren (1 Std. 120°C) im allgemeinen zu vollständiger Zerstörung.

2) Auf verschiedene Weise wurde versucht, ein O-5-Antigen zu gewinnen, das sich an Erythrocyten anlagern ließ. Zwei Vi-Antigen-Extraktionsmethoden erwiesen sich für O-5 als nicht geeignet. Durch Autoklavieren gewonnenes O-5-Antigen ließ sich nur ausnahmsweise anlagern. Die Phenol-Wasser-Extraktion in der Kälte und die Extraktion durch 1 Std. Kochen lieferten ein anlagerungsfähiges O-5-Antigen, mit dem sich in der indirekten Haemagglutination noch geringe O-5-Antikörper-Mengen nachweisen ließen.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Clark, W.R., J.McLaughlin and M.E.Webster
An aminohexuronic acid as the principal hydrolytic component of the Vi-antigen.
J. biol. chem. 230 81 - 89 (1958)

2) Davis, B., R.Dulbecco, H.N.Eisen, H.S.Ginsberg and W.B.Wood
Microbiology, New York, Evanston and London. Hoeber medical-division - Harper & Row. (1967)

3) Felix, A. (a)
The properties of different Salmonella-Vi-antigens.
J. Hyg. (Lond.) 50 515 - 539 (1952)

4) Felix, A. (b)
The Vi-antigen of Salmonella paratyphi B.
J. Hyg. (Lond.) 50 550 - 557 (1952)

5) Felix, A. and M. Pitt (a)
Virulence of B. typhosus and resistance to O-antibody.
J. Path. Bact. 38 409 - 420 (1934)

6) Felix, A. and M. Pitt (b)
A new antigen of B. typhosus. Its relation to virulence and to active and passive immunisation.
Lancet 227 186 - 191 (1934/II)

7) Felix, A. and M. Pitt
The Vi-antigen of various Salmonella types.
Brit. J. exp. Path. 17 81 - 86 (1936)

8) Felix, A., SS. Bhatnagar and M. Pitt
Observations on the properties of the Vi-antigen of B. typhosus.
Brit. J. exp. Path. 15 346 - 354 (1934)

9) Freeman, N.L., O. Felsenfeld and W.C. Eveland
Slide hemagglutinationstests with O-antigen of enteric organisms and Brucella.
Amer. J. clin. Path. 25 332 - 335 (1955)

10) Fulthorpe, A.J.
Agglutination of sheep erythrocytes sensitised with salmonella polysaccharides.
J. Path. Bact. 68 315 - 325 (1954)

11) Furth, J. and K. Landsteiner
Studies on the precipitable substances of Bacilli of the Salmonella group.
J. exp. Med. 49 727 - 743 (1929)

12) Hayes, L.
Specific serum agglutination of sheep erythrocytes sensitised with bacterial polysaccharides.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 29 51 - 62 (1951)

13) Heyns, K., G. Kiessling, W. Lindenberg, H. Paulsen and M.E. Webster
D.Galaktosaminuronsäure (2-Amino-2-Desoxy-D-Galaktosuronsäure) als Baustein des Vi-Antigens.
Chem. Ber. 92 2435 - 2438 (1959)

14) Kauffmann, F. (a)
Untersuchungen über die Körperantigene in der Salmonellen-Gruppe.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 117 778 - 791 (1936)

15) Kauffmann, F. (b)
Zur Frage des Vi-Antigens der Paratyphus B- und Mäusetyphus-Bazillen.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 118 318 - 327 (1936)

16) Kauffmann, F.
On the serology of the Salmonella-V-antigen.
Acta path. microbiol. scand. 24 591 - 594 (1947)

17) Kauffmann, F.
Enterobacteriaceae. Copenhagen, Denmark:
Ejnar Munksgaard (1951)

18) Keogh, E.V., E.A. North and M.F. Wartburton
Haemagglutinins of the Haemophilus group.
Nature 160 63 (1947)

19) Kern, L.F.
Über die Stellung der Vi-Haemagglutination in der serologischen Typhusdiagnose.
Med. Inaug.-Diss. Tübingen (1968)

20) Kotelko, K., A.M. Staub and R. Tinelli
Etude immunochemique sur les salmonella. VIII Rôle des groupements O-acétyl dans la specifité du facteur O-5.
Ann. Inst. Pasteur 100 618 - 637 (1961)

21) Kunin, C.M.
Distributation of antibodies against various non-enteropathic E. coli groups.
Arch. intern. Med. 110 182 - 192 (1962)

22) Kunin, C.M.
Separation, characterisation and biological significance of a common antigen in Enterobacteriaceae.
J. exp. Med. 118 565 - 586 (1963)

23) Kunin, C.M. and M.V. Beard
Serological studies of O-antigens of Escherichia coli by means of the hemagglutination test.
J. Bact. 85 541 - 548 (1963)

24) Landy, M.
On hemagglutination procedures utilising isolated polysaccharide and protein antigens.
Amer. J. publ. Hlth. 44 1059 - 1064 (1954)

25) Landy, M., A.G. Johnson and M.E. Webster
Studies on Vi-antigen. VIII. Role of acetyl in antigenic activity.
Amer. J. Hyg. 73 55 - 65 (1961)

26) Lüderitz, O., A.M. Staub and O. Westphal
Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae.
Bact. Rev. 30 192 - 255 (1966)

27) Lüderitz, O., O. Westphal, K. Sievers, E. Kröger, E. Neter und O.H. Braun
Über die Fixation von P^{32}-markiertem Lipopolysaccharid (Endotoxin) aus E. coli an menschlichen Erythrocyten.
Biochem. Z. 330 34 - 46 (1958)

28) Mikulaszek, E.
Symposium sur les mucopolyosides.
Varsovic: octobre 1959

29) Neter, E.
Bacterial hemagglutination and hemolysis.
Bact. Rev. 20 166 - 182 (1956)

30) Neter, E. and N. J. Zalewski
The requirement of electrolytes for the adsorption of Escherichia coli antigen by red blood cells.
J. Bact. 66 424 - 428 (1953)

31) Neter, E., N.J. Zalewski and D.A. Zak
Inhibition by lecithin and cholesterol by bacterial (Escherichia coli) hemagglutination and hemolysis.
J. Immunol. 71 145 - 151 (1953)

32) Neter, E., O. Westphal and O. Lüderitz
Effects of lecithin, cholesterol and serum on erythrocyte modification and antibody neutralisation by enterobacterial lipopolysaccharides.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 88 339 - 341 (1955)

33) Neter, E., O. Westphal, O. Lüderitz and E.A. Gorzynski
The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 66 141 - 156 (1956)

34) Neter, E., L.F. Bertram, D.A. Zak, M.R. Murdock and C.F. Arbesman
Studies on hemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera.
J. exp. Med. 96 1 - 15 (1952)

35) Neter, E., E.A. Gorzynski, N.J. Zalewski, R. Rachman and R.M. Gino
Studies on bacterial hemagglutination.
Amer. J. publ. Hlth. 44 49 - 54 (1954)

36) Neter, E., E.A. Gorzynski, R.M. Gino, O. Westphal and O. Lüderitz
The enterobacterial hemagglutination test and its diagnostic potentialities.
Canad. J. Microbiol. 2 232 - 244 (1956)

37) Neter, E., O. Westphal, O. Lüderitz, E.A. Gorzynski and E. Eichenberger
Studies of enterobacterial lipopolysaccharides.
Effects of heat and chemicals on Erythrocyte-modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties.
J. Immunol. 76 377 - 385 (1956)

38) Sieburth, J. Mc.N.
Indirect hemagglutination studies on salmonellosis of chickens.
J. Immunol. 78 380 - 386 (1957)

39) Spaun, J.
On the determination of Vi-antibodies by hemagglutination.
Acta path. microbiol. scand. 29 416 - 418 (1951)

40) Spaun, J.
Determination of Salmonella typhi O- and Vi-antibodies by hemagglutination.
Acta path. microbiol. scand. 31 462 - 469 (1952)

41) Staub, A.M.
Rôle des anticorps antipolyosidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques.
Ann. Inst. Pasteur 86 618 - 635 (1954)

42) Walter, B.
Bestimmung der Antikörper gegen Escherichia coli, Pasteurella pseudotuberculosis und Salmonella typhi in Seren gesunder Kinder verschiedener Altersstufen mit der Methode der indirekten Haemagglutination.
Med. Inaug.-Diss. Tübingen (1968)

43) Webster, M.E., W.R. Clark and M.E. Freeman
Evidence for an aminohexuronic acid as an hydrolytic product of Vi-antigen.
Arch. Biochem. 50 223 - 224 (1954)

44) Westphal, O.
Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à Gram négatif.
Ann. Inst. Pasteur 98 789 - 813 (1960)

45) Westphal, O., O. Lüderitz und F. Bister
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z. Naturforsch. 7 b 148 - 155 (1952)

46) Wright, G.G. and R.J. Feinberg
Hemagglutination by tularemia antisera.
J. Immunol. 68 65 - 71 (1952)

Herrn Professor Dr. med. R.-E. Bader danke ich für den freundlicherweise überlassenen Arbeitsplatz. Insbesondere möchte ich ihm meinen Dank dafür aussprechen, daß er mir bei allen auftauchenden Fragen und Problemen jederzeit seine Unterstützung gewährte.

Mein besonderer Dank gilt auch der medizinisch-technischen Assistentin Fräulein Ringwald, die mit ihrer Hilfe wesentlich zur reibungslosen Durchführung der Arbeit beitrug.

Lebenslauf

Am 24. Juli 1942 wurde ich, Peter Kimmig, als Sohn des jetzigen Universitäts-Professors Dr. Wolfgang Kimmig und seiner Ehefrau Suse, geb. Weber in Baden-Baden geboren. Von 1948 - 1952 besuchte ich die Volksschule in Burrweiler/Pfalz und Freiburg i. Br., von 1952 - 1956 das neusprachliche Keplergymnasium in Freiburg und von 1956 - 1962 das humanistische Uhlandgymnasium in Tübingen, wo ich am 7. März 1962 das Abitur ablegte. Nach anschließendem 1 1/2-jährigem Wehrdienst begann ich im Wintersemester 1963 in Tübingen mit dem Medizinstudium. Im Oktober 1964 bestand ich hier das Vorphysikum, studierte dann 3 Semester bis zum Physikum im März 1966 in Marburg/Lahn und kehrte nach 1 Semester in Wien wieder nach Tübingen zurück. Im August 1969 schloß ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab.